



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 319 056**

⑫ Número de solicitud: 200702285

⑬ Int. Cl.:  
**A61K 47/00** (2006.01)  
**A61N 5/06** (2006.01)  
**B22F 1/00** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **14.08.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2009**

Fecha de la concesión: **27.01.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **15.02.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**15.02.2010**

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas** (Titular al 70 %)  
**c/ Serrano nº 117**  
**28006 Madrid, ES**  
**Universidad Politécnica de Valencia** (Titular al 30 %)

⑱ Inventor/es: **Botella Asunción, Pablo;**  
**Corma Canós, Avelino;**  
**Navarro Villalba, María Teresa y**  
**Fernández Jover, Eduardo**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Material híbrido nanoestructurado que comprende nanopartículas de oro método de preparación y uso.**

㉑ Resumen:

Material híbrido nanoestructurado que comprende nanopartículas de oro, método de preparación y uso.  
La presente invención se refiere a un material híbrido nanoestructurado compuesto de al menos dos componentes: un núcleo metálico, constituido por dos o más nanopartículas de oro, dando lugar a un agregado o nanocluster de oro y una matriz de un compuesto inorgánico, preferentemente sílice, que envuelve el núcleo metálico, capaz de absorber la radiación infrarroja cercana y su utilización en una aplicación biotecnológica, preferentemente, el tratamiento o profilaxis de una patología por terapia fototérmica.

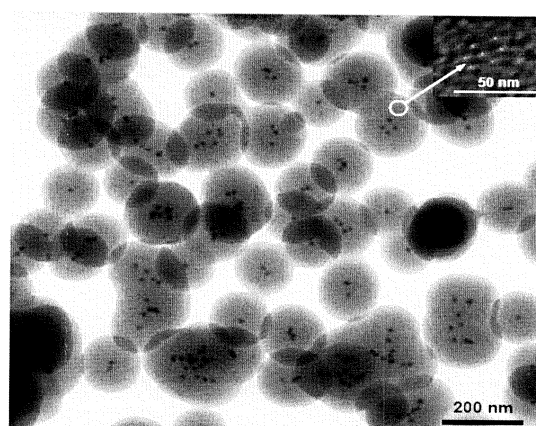


Figura 3

ES 2 319 056 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Material híbrido nanoestructurado que comprende nanopartículas de oro método de preparación y uso.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se enmarca dentro de las aplicaciones de la nanotecnología y la biomedicina. La preparación de partículas coloidales de oro estables en medios biológicos requiere de su protección mediante una cubierta externa. La incorporación de 2 o más nanopartículas de oro dentro de una misma cápsula conlleva la interacción entre las mismas frente a estímulos electromagnéticos. Ello permite su aplicación como herramientas de diagnóstico, control de la liberación de fármacos o tratamientos por fototermia.

**Estado de la técnica anterior a la invención**

Actualmente existe un interés creciente en el desarrollo de estructuras con propiedades ópticas controladas a escala nanométrica, con el fin de aplicarlas en sistemas biotecnológicos para diagnóstico y terapia de enfermedades a escala celular. Así, el tratamiento de enfermedades consecuencia de una degeneración celular, p.e. el cáncer, precisa de la eliminación selectiva de las células malignas sin dañar los tejidos adyacentes. Una de las posibles actuaciones es la terapia térmica en la que el tejido lesionado se irradia con una fuente de calor para producir hipertermia. El aumento de temperatura asociado causa numerosas interacciones biológicas a nivel celular, como la desnaturalización de las proteínas y ácidos nucleicos, necrosis celular, ruptura de membranas, etc. Como fuentes de calor se ha empleado microondas, ultrasonidos y radiación láser de alta frecuencia. Esta técnica, sin embargo, presenta como principal inconveniente la escasa selectividad, destruyendo tanto las células malignas como las sanas, con un riesgo elevado de quemaduras en el cuerpo del paciente cuando la exposición a la radiación térmica se mantiene durante periodos prolongados.

Una modificación de dicha técnica es la terapia fototérmica, basada en la incorporación de un componente ópticamente activo a las células, que absorbe la luz infrarroja en el intervalo de 800-1300 nm, en el que los tejidos biológicos presentan escasa o nula absorbancia. De esta manera, el calor se genera únicamente en las células provistas del material absorbente. La destrucción celular tiene lugar por hipertermia pero también debido a las tensiones ocasionadas por la formación de burbujas consecuencia de la evaporación del medio líquido circundante a las partículas del material fotosensible, pudiendo llevar a la lisis celular (fototermolisis).

En la solicitud de patente US2007091967 se describe un material compuesto de una matriz polimérica conteniendo nanopartículas de rodamina 590 o rodamina 610, capaz de dispersar la luz láser de 585-630 nm, si bien dicho intervalo queda muy lejos de la longitud de onda necesaria en tratamientos fototérmicos.

En el caso de nanopartículas metálicas con propiedades ópticas, se ha descrito (W.S. Seo, J.H. Lee, X. Sun, Y. Suzuki, D. Mann, Z. Liu, M. Terashima, P.C. Yang, M.V. McConnell, D.G. Nishimura y H. Dai, Nature Mater. 5, 971 (2006)) el uso de nanocristales de Fe/Co encapsulados en una cubierta de grafito capaces de absorber la radiación láser de 808 nm de longitud de onda. Si bien no se ha comprobado la actividad de dicho sistema en medios biológicos, la presencia de componentes potencialmente tóxicos en el organismo limita sus aplicaciones terapéuticas.

Por el contrario, las partículas de oro coloidal constituyen una opción de fácil preparación y altamente biocompatible. Estas presentan una resonancia plasmónica centrada a 520 nm (para un diámetro medio de la nanopartícula de 10 nm), si bien dicho máximo de absorbancia puede desplazarse unos 30 nm al modificar el diámetro de partícula, el ligando empleado para su estabilización o el disolvente. Sin embargo, el uso de estas nanopartículas en tratamientos de fototermia queda limitado por la escasa absorbancia que presentan en el intervalo de 800-1300 nm, correspondiente a la radiación infrarroja cercana. Se han utilizado nanopartículas de sílice protegidas por una cubierta delgada de oro de espesor variable como agente fotosensible. Estas nanocubiertas de oro se tratan en US-6.530.944. La ventaja de dicho material es la posibilidad de modular el máximo de resonancia plasmónica variando el diámetro total de las nanopartículas y el espesor de la cubierta de oro. De esta forma, resulta posible elaborar nanocubiertas de oro con una resonancia plasmónica centrada a 800 nm. Sin embargo, existen importantes inconvenientes para su aplicación en organismos vivos. De un lado, la superficie externa accesible para su funcionalización con sustancias químicas (fármacos, biomarcadores) y anticuerpos específicos de receptores de membrana de las células objetivo es limitada. De otro lado, la estabilidad en fluidos biológicos es baja, con una considerable tendencia a la agregación y formación de depósitos metálicos.

En la solicitud WO06122222 se detalla la preparación de nanovarillas de oro de dimensiones controladas y sus aplicaciones en diagnóstico y fototermolisis. Variando la forma (determinada por la relación de diámetros máximo y mínimo) es posible obtener partículas del metal noble con un máximo de absorción centrado en el infrarrojo cercano. Este material presenta, no obstante, las mismas limitaciones que las nanocubiertas de oro para aplicaciones biotecnológicas.

Se ha descrito la preparación de nanoclusters de oro por agregación controlada de nanopartículas de oro (B. Khlebtsov, V. Zharov, A. Melnikov, V. Tuchin y N. Khlebtsov, Nanotechnology 17, 5167 (2006)) y su aplicación en fototermolisis (V.P. Zharov, K.E. Mercer, E.N. Galitovskaya y M.S. Smeltzer, Biophysical Journal 90, 619 (2006)). A partir de partículas de oro de diámetro entre 30 y 40 nm se obtiene, por agregación, nanoclusters entre 100 y

200 nm. Como consecuencia, el máximo de resonancia plasmónica se desplaza desde 530 nm de las nanopartículas monodispersas hasta unos 650 nm. Asimismo, el intervalo de relajación térmica aumenta en estos nanoclusters, lo que se traduce en un efecto fototérmico más intenso. Además, la presencia de varias nanopartículas juntas o próximas genera un efecto sinérgico consistente en un solapamiento de las nanoburbujas correspondientes a las partículas simples, dando lugar a una burbuja de mayores dimensiones de efectos más destructivos sobre la estructura celular. A pesar de su probada ausencia de citotoxicidad, estos nanoclusters presentan el problema de la estabilidad en medios biológicos. La presencia de especies iónicas en fluidos corporales disminuye el potencial Z del coloide de oro, lo que conduce a la formación de agregados metálicos que precipitan. Además, los ligandos orgánicos empleados para estabilizar los nanocluster en medio acuoso pueden provocar una respuesta inmune que conduzca a su eliminación del torrente sanguíneo.

En función de lo expuesto, y para superar los inconvenientes de los materiales conseguidos hasta ahora, se ha planteado como muy interesante encapsular las nanopartículas de oro dentro de una cubierta protectora que les confiera estabilidad y carácter inerte frente al sistema inmunitario y a la vez permita un alto grado de funcionalización. Secundariamente, la inclusión de partículas coloidales de oro y/o sus agregados (se considera 2 partículas agregadas cuando la distancia entre ellas es inferior a su diámetro medio) evitaría la extravasación y la rápida excreción por vía renal.

El encapsulamiento en sílice resulta particularmente ventajoso en la medida en que permite controlar los parámetros texturales de la cubierta y al mismo tiempo ofrece numerosas posibilidades de funcionalización. En este sentido, resulta especialmente conveniente la incorporación de nanopartículas de oro en una matriz de sílice mesoporosa, pudiendo conseguir un alto grado de ordenación de sus poros, con tamaño de poro controlable y una elevada área superficial. Así, en la solicitud de patente US-2003157330 se describe un procedimiento de recubrimiento mediante propagación de la pared de MCM-41 por hidrólisis controlada de un alcóxido de silicio sobre una nanopartícula de oro en presencia de un surfactante, obteniendo un nanocomposite Oro-MCM41 con un núcleo metálico constituido por una única partícula de oro, generalmente centrada en la matriz de silicato, y un diámetro medio entre 300 y 500 nm. La eliminación del oro por disolución da lugar a nanopartículas huecas, reivindicando que su interior puede utilizarse para el transporte de catalizadores, colorantes orgánicos y moléculas biológicamente activas. El método de preparación de estos materiales y sus precursores presenta dos limitaciones: de un lado, la dificultad de incorporar simultáneamente los dos componentes de la mesofase sílice- surfactante, para minimizar la autonucleación de partículas de sílice pura. De otro lado, la productividad del proceso de síntesis resulta muy reducida para partículas menores de 200 nm, necesitando emplear grandes volúmenes del coloide de oro inicial. Asimismo, el material precursor que contiene una partícula de oro presenta una banda de absorbancia plasmónica centrada entre 520 y 550 nm, (característica de nanopartículas de oro monodispersas), con escasa o nula absorbancia en el intervalo de 800-1300 nm, lo que limitaría seriamente su utilización en tratamientos de fototerapia.

Se ha observado que, sorprendentemente, si en vez de encapsular solo una, encapsulamos dos o más nanopartículas de oro, de tamaño comprendido entre 10 y 60 nm, dentro de una matriz de un compuesto inorgánico, preferentemente de silicio, y más preferentemente, sílice no estructurada y no porosa, o sílice no estructurada con porosidad en el intervalo del mesoporo, o sílice estructurada y mesoporosa, dando lugar a una nanopartícula oro-sílice de forma esférica, hexagonal o alargada y tamaño comprendido entre 80 y 450 nm, se consigue un efecto fototérmico mucho más conveniente. En la presente invención se reivindica este tipo de material, un método de preparación del mismo, así como su utilización como agente ópticamente activo con propiedades fototérmicas.

## Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un material híbrido nanoestructurado que contiene nanopartículas de oro, a la preparación de dicho material y su utilización en aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo, imagen, diagnóstico, tratamiento o profilaxis de una patología.

Un objeto de la presente invención es un material híbrido nanoestructurado que comprende al menos dos componentes:

- un núcleo metálico, que comprende nanopartículas de oro, dando lugar a un agregado, más específicamente un nanocluster de oro y
- una matriz que envuelve el núcleo metálico.

Una realización particular del material es un material híbrido nanoestructurado que comprende al menos dos componentes:

- un núcleo metálico, constituido por dos o más partículas coloidales de oro, dando lugar a un agregado, más específicamente un nanocluster de oro, y
- una matriz no estructurada y no porosa que envuelve el núcleo metálico.

## ES 2 319 056 B1

Una realización particular adicional del material es un material híbrido nanoestructurado que comprende al menos dos componentes:

- un núcleo metálico, constituido por dos o más partículas coloidales de oro, dando lugar a un nanocluster de oro, y
- una matriz no estructurada y porosa, con diámetro de poro comprendido entre 1 y 100 nm, que envuelve el núcleo metálico, que preferentemente es de sílice.

Una realización particular adicional del material es un material híbrido nanoestructurado que comprende al menos dos componentes:

- un núcleo metálico, constituido por dos o más partículas coloidales de oro, dando lugar a un nanocluster de oro, y
- una matriz estructurada y porosa, con diámetro de poro comprendido entre 1 y 30 nm, que envuelve el núcleo metálico, preferentemente dicha matriz es de un compuesto de silicio, y más preferentemente de sílice. Preferentemente dicha matriz porosa es mesoporosa.

Una realización particular adicional preferente del material es un material híbrido nanoestructurado que comprende al menos dos componentes:

- un núcleo metálico, constituido por dos o más partículas coloidales de oro, dando lugar a un nanocluster de oro, y
- una matriz no estructurada y no porosa, que es de un compuesto de silicio, preferentemente de sílice.

Una realización particular adicional más preferente del material híbrido nanoestructurado es una en la que la matriz que envuelve el núcleo metálico es estructurada y porosa y presenta orden a larga distancia. Preferentemente, según esta realización, el diámetro de poro está comprendido entre 1 y 30 nm y dicha matriz es de sílice. De modo más preferente aún, dicha matriz silícea está seleccionada entre una matriz con estructura tipo MCM-41, MCM-48, MCM-50, FSM-16, HMS, KIT-1, MSU-1, MSU-2, MSU-3, MSU-V, SBA-1, SBA-2, SBA-3, SBA-8, SBA-11, SBA-12, SBA-14, SBA-15, SBA-16, STAC-1,  $M\alpha$  y PCH.

Cuando la matriz de sílice es estructurada y porosa, la distancia centro de poro a centro de poro en la matriz puede estar comprendida entre 3,1 y 4,5 nm, preferentemente 3,4 y 4,2 nm, y el espesor de la pared oscila entre 0,7 y 2,5 nm, preferentemente entre 1 y 2 nm.

En el material híbrido de la invención las nanopartículas material pueden presentar forma esférica, hexagonal o alargada.

En el material híbrido de la invención las nanopartículas pueden presentar un diámetro medio comprendido entre 70 y 320 nm, preferentemente, entre 80 y 300 nm.

En el material híbrido de la invención las nanopartículas contienen preferentemente entre 2 y 25 nanopartículas de oro, preferentemente entre 2 y 20 nanopartículas de oro dentro de la matriz.

Según realizaciones preferentes, el material híbrido de la invención está compuesto de nanopartículas de oro que presentan un tamaño uniforme comprendido entre 7 y 65 nm, preferentemente entre 10 y 60 nm.

Un segundo objeto de la invención es un método de preparación del material híbrido definido anteriormente que comprende poner en contacto una solución coloidal de oro con una solución acuosa de un compuesto inorgánico y mantener la agitación para permitir el crecimiento de la matriz inorgánica que envuelve al núcleo metálico en torno al nanocluster de oro.

Dicho método puede comprender además lavar y secar el material híbrido obtenido a una temperatura de al menos 90°C preferentemente al menos 100°C.

El producto formado después de ser lavado y secado puede utilizarse tal cual, o bien puede hacerse reaccionar con la disolución acuosa de al menos un surfactante orgánico y posteriormente ser calcinado en aire.

En el método de la invención preferentemente dicho compuesto inorgánico es un compuesto de silicio. De modo más preferente dicho compuesto de silicio está seleccionado entre un alcóxido de silicio, un alquilsilano, silicato sódico y sílice coloidal.

## ES 2 319 056 B1

El método de preparación del material híbrido también puede comprender además introducir un co-solvente a la solución acuosa del compuesto inorgánico con una relación co-solvente:agua en volumen comprendida entre 1:0,8 y 5:0,9 más preferentemente entre 1:1 y 4:1. Según esta realización, preferentemente dicho compuesto inorgánico es un compuesto de silicio, y dicho co-solvente es preferentemente un alcohol de cadena alifática con un número de carbonos comprendido entre 1 y 6.

Según una realización preferente del método de preparación del material híbrido, el método comprende lavar y secar el material híbrido formado e introducir dicho material híbrido en una disolución acuosa de una fuente de fluoruro. Según esta realización, dicha disolución acuosa es preferentemente una solución de un compuesto de silicio, más preferentemente sílice.

Según una realización aún más preferente, el método de preparación del material híbrido comprende además:

- lavar y secar el material híbrido formado usando un compuesto de silicio, preferentemente, alcóxido de silicio, un alquilsilano, silicato sódico o sílice coloidal,
- introducir dicho material híbrido en una disolución acuosa de una fuente de fluoruro, preferentemente, ácido fluorhídrico o una sal amónica, sódica o potásica del mismo, con una relación molar  $\text{SiO}_2/\text{F}^-$  comprendida entre 4 y 520, más preferentemente entre 5 y 500,
- calentar el gel resultante a una temperatura entre 15 y 110°C, más preferentemente entre 20 y 100°C, durante un periodo entre 0,5 y 185 horas, más preferentemente entre 1 y 180 horas, y
- lavar el sólido obtenido secar dicho sólido a una temperatura no inferior a 90°C, más preferentemente de al menos 100°C.

Se puede introducir además un co-solvente en la solución acuosa del compuesto de silicio, estando dicho co-solvente preferentemente presente en una relación co-solvente:agua, en volumen comprendida entre 1:1 y 4:1.

Una realización adicional del método de preparación del material híbrido se refiere a la preparación del material híbrido con una matriz estructurada y porosa, con diámetro de poro comprendido entre 0,5 y 35 nm, preferentemente entre 1 y 30 nm, y dicho método comprende:

- poner en contacto una solución coloidal de oro con una solución acuosa de un compuesto inorgánico, preferentemente de un compuesto de silicio, y más preferentemente aún, seleccionado entre un alcóxido de silicio, un alquilsilano, silicato sódico y sílice coloidal,
- mantener la agitación para permitir el crecimiento de la matriz inorgánica, que envuelve al núcleo metálico en torno al nanocluster de oro,
- lavar y secar el material híbrido formado,
- introducir el material híbrido en una disolución acuosa de al menos un surfactante orgánico, preferentemente un compuesto catiónico, aniónico o neutro, con una relación molar  $\text{SiO}_2$ :surfactante comprendida entre 0,005 y 0,65, preferentemente entre 0,01 y 0,60, obteniendo un gel,
- calentar el gel resultante a una temperatura entre 55 y 220°, preferentemente entre 60 y 200°C durante un periodo entre 0,05 y 185 horas, preferentemente entre 0,1 y 180 horas, y
- lavar y secar el sólido obtenido a una temperatura de al menos 400°C, preferentemente al menos 450°C, obteniéndose el material híbrido que comprende una matriz estructurada y porosa, con diámetro de poro comprendido entre 0,5 y 35 nm, preferentemente entre 1 y 30 nm.

Según esta realización la matriz inorgánica es preferentemente de un compuesto de silicio, y se introduce un co-solvente, que preferentemente es un alcohol de cadena alifática con un número de carbonos comprendido entre 1 y 6, a la solución acuosa del compuesto de silicio en una relación co-solvente:agua en volumen comprendida entre 1:1 y 4:1.

El material híbrido de la presente invención está compuesto preferentemente de nanopartículas de forma esférica, hexagonal o alargada y sus dimensiones corresponden al intervalo entre 70 y 480 nm, preferentemente entre preferentemente entre 80 y 450 nm, y más preferentemente entre 100 y 250 nm mientras que las nanopartículas de oro encapsuladas presentan un tamaño uniforme comprendido entre 10 y 60 nm, y preferentemente entre 20 y 30 nm. Preferentemente además dichas nanopartículas son de oro-sílice. De modo más preferentemente aún, el material híbrido está constituido por nanopartículas de oro-sílice conteniendo 2 o más partículas coloidales de oro hasta un máximo de 20 por razón de las dimensiones totales de la nanopartícula.

La matriz de compuesto inorgánico, preferentemente de compuesto de silicio, y más preferentemente de sílice, estabiliza las partículas coloidales de oro en medios biológicos, evitando fenómenos de agregación no controlada,

reacciones inmunitarias, extravasación y excreción vía renal excesivamente rápida, a la vez que introduce numerosas posibilidades de funcionalización.

Un objeto adicional de la presente invención es el uso del material híbrido definido anteriormente en una aplicación biotecnológica, comprendiendo dicho uso:

a. poner en contacto una o más células con nanopartículas del material híbrido y

b. exponer las células conteniendo las nanopartículas del material híbrido a una fuente de radiación electromagnética cuya longitud de onda esté comprendida en el intervalo de absorbanza plasmónica de las nanopartículas y nanoclusters de oro.

Preferentemente dicha radiación electromagnética es una fuente de luz blanca.

Dicha aplicación biotecnológica es preferentemente un método de tratamiento o profilaxis de una patología.

Se ha visto que los agregados conteniendo dos o más nanopartículas de oro o nanoclusters absorben la luz en el espectro visible e infrarrojo cercano. La absorbanza resulta extremadamente dependiente al tamaño y grado de agregación de las nanopartículas de oro. Así, los nanoclusters encapsulados dentro de las nanoesferas, preferentemente de sílice, descritas en la presente invención presentan resonancia plasmónica a longitudes de onda superiores respecto de las nanopartículas de oro monodispersas, pudiendo mostrar bandas de absorbanza entre 800 y 1400 nm, dependiendo del tamaño y forma de los nanoclusters. Al someter las nanopartículas oro-sílice a un estímulo electromagnético el intervalo de relajación térmica aumenta, lo que se traduce en un efecto fototérmico más intenso.

La luz absorbida por las nanopartículas se convierte rápidamente en calor en la escala del picosegundo debido a interacciones electrón-fonón y fonón-fonón. El incremento de temperatura resultante es suficiente para causar la muerte celular, lo que permite llevar a cabo una terapia fototérmica. Además, los materiales objeto de la presente invención permiten el anclaje de un fármaco y/o un biomarcador sobre la superficie de sílice que conforma las nanoesferas.

Un objeto particular adicional de la invención es el uso del material híbrido definido anteriormente en un método de tratamiento o profilaxis de una patología "*in vivo*" que comprende:

a. poner en contacto los tejidos afectados o supuestamente afectados por la patología con nanopartículas del material híbrido definido y

b. exponer los tejidos a una fuente de radiación electromagnética cuya longitud de onda esté comprendida en el intervalo de absorbanza plasmónica de las nanopartículas y nanoclusters de oro, preferentemente luz, y más preferentemente luz blanca.

La radiación electromagnética administrada no debe resultar citotóxica para las células que no han incorporado las nanopartículas del material híbrido.

Preferentemente, según este método, los tejidos afectados por la patología se encuentran a menos de 10 cm de la superficie exterior del huésped.

La concentración de nanopartículas del material híbrido en el tejido irradiado puede variar entre 10 y 1000  $\mu\text{g cm}^{-3}$ .

La patología mencionada consiste preferentemente en una infección viral, infección fúngica, infección bacteriana o tumor.

La intensidad de la radiación electromagnética debe ser suficiente para generar calor en las nanopartículas en cantidad efectiva para destruir o lesionar irreversiblemente las células del tejido patógeno.

Las nanopartículas del material híbrido son administradas al huésped preferentemente mediante inyección intravascular en concentración suficiente para alcanzar de forma no selectiva los tejidos patógenos, preferentemente son administradas al huésped mediante inyección directa en la zona lesionada, acumulándose en el tejido intersticial.

Dichas nanopartículas del material híbrido pueden ser combinadas con una sustancia biomarcadora de una determinada enfermedad o patología, que conduce selectivamente las nanopartículas al tejido dañado, favoreciendo, asimismo, el acceso por endocitosis a sus células.

De manera preferente la sustancia biomarcadora comprende un metabolito de la síntesis proteica, tal como el ácido fólico o el ácido 5-aminolevulínico.

Según realizaciones adicionales, de manera preferente, la sustancia biomarcadora comprende un anticuerpo, aptámero, carbohidrato, polipéptido, lípido o ácido nucleico.

En una realización preferida de la presente invención se utiliza el material híbrido en un método para tratar una patología en un paciente por administración de nanopartículas de material híbrido, preferentemente de oro- sílice, que pueden contener un fármaco y/o un biomarcador, y exposición del mismo a la radiación infrarroja cercana.

5 De manera preferida, la patología debe encontrarse a no más de 10 cm de la superficie exterior irradiada del paciente.

De manera preferida la patología a tratar por terapia fototérmica es una infección viral, infección fúngica, infección bacteriana o tumor.

10 De manera preferida, las nanopartículas de material híbrido de la invención, preferentemente, de oro-sílice descritas presentan bandas de absorción de resonancia plasmónica entre 800 y 1400 nm. La intensidad de la luz irradiada es la necesaria para destruir térmicamente las células y tejidos afectados por la patología.

15 En una realización preferente la fuente de luz empleada es un láser pulsado, emitiendo a una longitud de onda entre 800 y 1300 nm con una potencia entre 1 y 60 W cm<sup>-2</sup> durante un periodo entre 0,01 y 60 min. La potencia necesaria para destruir las células patógenas depende de la concentración de nanopartículas Oro-Sílice en el tejido irradiado.

20 En una realización adicional, la concentración de nanopartículas oro-sílice en el tejido irradiado varía entre 10 y 1000<sup>-3</sup> µg cm<sup>-3</sup>, y preferentemente entre 50 y 200 µg cm<sup>-3</sup>.

25 Las citadas nanopartículas de Oro-Sílice pueden ser administradas al paciente mediante inyección intravascular en concentración suficiente para alcanzar de forma no selectiva los tejidos patógenos. El aumento de la permeabilidad capilar asociado a muchas lesiones permite la extravasación de las nanopartículas a nivel de los mismos, acumulándose en la matriz extracelular.

Alternativamente, las nanopartículas Oro-Sílice pueden ser inyectadas directamente en la región dañada, acumulándose en el tejido intersticial.

30 En una realización preferida, las nanopartículas Oro- Sílice pueden conjugarse con una sustancia que dirija estas selectivamente a las células patógenas, favoreciendo, asimismo, el acceso por endocitosis a las mismas. Entre dichas sustancias se encuentran, por ejemplo, el ácido fólico, ácido 5-aminolevulínico, anticuerpos de receptores de membrana, aptámeros, carbohidratos, polipéptidos, lípidos y ácidos nucleicos.

### 35 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el espectro de absorbancia UV-Vis de una disolución coloidal de oro, constituida por nanopartículas de oro de diámetro medio 15 nm.

40 La Figura 2a muestra el difractograma tipo de las nanoesferas de un material híbrido Oro-Sílice de la presente invención sin calcinar. La figura 2b muestra el difractograma tipo de las nanopartículas de un material híbrido Oro-Sílice de la presente invención calcinado en aire a 540°C.

45 La Figura 3 muestra una microfotografía de microscopía electrónica de transmisión de las nanoesferas de un material híbrido Oro-Sílice de la presente invención con un núcleo metálico compuesto preferentemente entre 2 y 10 nanopartículas de oro. En recuadro se muestra la simetría hexagonal de la cubierta mesoporosa.

50 La Figura 4 muestra el espectro de absorbancia UV-Vis de las nanoesferas del material híbrido Oro-Sílice con un núcleo metálico compuesto preferentemente entre 2 y 10 partículas coloidales de oro. Junto a la banda de absorbancia plasmónica característica de las nanopartículas de oro, centrada a 530 nm, se observa una segunda banda de absorción entre 800 y 1400 nm, con un máximo a 1110 nm.

55 La Figura 5a-b muestra sendas microfotografías de microscopía electrónica de transmisión de una sección de células de glioma humano de la línea 42-MG-BA tras incorporar las nanoesferas de un material híbrido Oro- Sílice de la presente invención con un núcleo metálico compuesto preferentemente entre 2 y 10 nanopartículas de oro y concentración de 100 µg cm<sup>-3</sup>.

60 La Figura 6a-b muestra microfotografías de microscopía de contraste de fases de un cultivo control de células de glioma humano de la línea 42-MG-BA antes (Figura 6a) y después (Figura 6b) de la irradiación con un haz láser de 800 nm y 38 W cm<sup>-2</sup> durante 16 min. No se aprecia muerte celular como consecuencia del tratamiento fototérmico. La figura 6c-d muestra microfotografías de microscopía de contraste de fases de un cultivo de células de glioma humano de la línea 42-MG-BA tras incorporar las nanoesferas de un material híbrido Oro-Sílice de la presente invención con un núcleo metálico compuesto preferentemente entre 2 y 10 nanopartículas de oro y concentración de 100 µg cm<sup>-3</sup> antes (Figura 6c) y después (Figura 6d) de la irradiación con un haz láser de 800 nm y 38 W cm<sup>-2</sup> durante 16 min. Se observa una clara destrucción celular, superior al 70%, tras el tratamiento fototérmico.

**Modos de realización de la invención**

Los ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitarla en ningún caso.

## 5 Ejemplo 1

*Preparación de nanoesferas Oro-Sílice*

10 500 ml de una disolución de  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$   $5,0 \times 10^{-4}$  M en agua desionizada se llevan a ebullición y se añade 3,0 ml de una disolución de citrato sódico  $1,6 \times 10^{-3}$  M. Se obtiene una disolución color rojo oscuro de nanopartículas de oro con un diámetro medio de 15 nm. La ausencia de agregados en esta disolución se confirma por su espectro UV-Vis (ver Figura 1).

15 Sobre la disolución de color rojo se añade 2,5 ml de 3-aminopropiltrimetoxisilano  $10^{-3}$  M y se agita vigorosamente. Pasados 30 min, se introduce 20 ml de una disolución de silicato sódico conteniendo 0,54%  $\text{SiO}_2$  a pH=10-11 y se agita vigorosamente. La dispersión resultante se deja en agitación durante 48 h, tiempo durante el cual se deposita una película de sílice sobre la superficie de las nanopartículas de oro de espesor entre 2 y 4 nm. A continuación, se separa las nanopartículas de oro por centrifugación (4.000 rpm; 6h) y se redispersan en 500 ml de agua desionizada.

20 80 ml de este coloide se diluyen en 400 ml de una mezcla etanol:agua 2,5:1 v/v y se añade 0,56 ml de NaOH. A continuación se introduce 0,24 ml de tetraetilortosilicato (TEOS), se agita vigorosamente la mezcla durante 24 h, se adiciona 0,24 ml más de TEOS y se mantiene la agitación otras 24 h. Seguidamente se centrifuga la mezcla (4.000 rpm; 3 h) y se elimina el sobrenadante. Se obtiene un residuo de nanoesferas Oro-Sílice constituidas por un núcleo de nanopartículas de oro encapsuladas en la matriz de sílice no estructurada y no porosa, con un diámetro total comprendido entre 100 y 140 nm y un número de nanopartículas de oro en cada nanoesfera de Oro-Sílice preferentemente entre 2 y 20, más preferentemente entre 2 y 10.

25 0,32 g de estas nanoesferas Oro-Sílice se incorporan a una disolución alcalina de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, con la siguiente composición molar de la mezcla:

30  $\text{SiO}_2$  : 0,11      CTAB : 0,24      NaOH : 395       $\text{H}_2\text{O}$  : 36 EtOH

35 donde CTAB es el bromuro de hexadeciltrimetilamonio y EtOH es etanol. Tras agitar la mezcla durante 15 min se trasvasa a un autoclave y se mantiene en estático a  $100^\circ\text{C}$  durante 4 h. El sólido final se separa por centrifugación (4.000 rpm; 30 min), se lava con agua desionizada y se seca en estufa a  $50^\circ\text{C}$  durante 12 h. Finalmente, se calcina en aire seco a  $540^\circ\text{C}$  durante 6 h. Se obtienen nanoesferas Oro-Sílice constituidas por un núcleo de nanopartículas de oro encapsuladas en la matriz de sílice mesoporosa con estructura hexagonal (Figura 2) y elevada área superficial ( $960 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ), con un diámetro total comprendido entre 100 y 140 nm y un número de nanopartículas de oro en cada nanoesfera preferentemente entre 2 y 10 (Figura 3).

40 Como consecuencia de la agregación de varias nanopartículas de oro dentro de una misma nanoesfera Oro-Sílice aparece una banda de absorción secundaria en el espectro de resonancia plasmónica del metal, comprendida entre 800 y 1400 nm (Figura 4).

## 45 Ejemplo 2

*Introducción de nanoesferas Oro-Sílice en el interior celular*

50 Células de glioma humano de la línea 42-MG-BA son cultivadas en placa y medio MEM según un protocolo estándar. Las placas son incubadas en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%, a  $37^\circ\text{C}$ . Tras 24 h de incubación se introducen en el cultivo celular las nanoesferas Oro-Sílice con matriz de sílice mesoporosa estructurada del Ejemplo 1 con una concentración de  $100 \mu\text{g cm}^{-3}$ .

55 En la Figura 5 se muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión (JEOL/JEM-1011 Electron Microscope) en las que se comprueba que las nanoesferas Oro-Sílice penetran en el citoplasma de las células.

## Ejemplo 3

60 *Irradiación láser de células en ausencia de las nanoesferas Oro-Sílice*

Células de glioma humano de la línea 42-MG-BA son cultivadas en placa y medio MEM según un protocolo estándar. Las placas son incubadas en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%, a  $37^\circ\text{C}$ . Tras 24 h de incubación se exponen las células a la luz de un láser pulsado (Titanio:Zafiro/Mira 900-F), emitiendo a 800 nm con pulsos de  $10^{-16}$  s. Se varía la potencia del láser entre 90 y 300 mW, utilizando un haz de 1 mm de diámetro (respectivamente, 11 y  $38 \text{ W cm}^{-2}$ ). Las placas son irradiadas longitudinalmente describiendo líneas de puntos en las que de forma creciente se varía el tiempo de exposición al haz láser. Dicho tiempo de irradiación oscila entre 0,01 y 24 min.



## ES 2 319 056 B1

En la Figura 6a-b se muestra las imágenes obtenidas en el microscopio de contraste de fases de las células antes y después de la exposición a la radiación infrarroja. No se observa muerte celular tras 16 min de exposición a un haz de  $38 \text{ W cm}^{-2}$ .

### 5 Ejemplo 4

#### *Irradiación láser de células en presencia de las nanoesferas Oro-Sílice*

10 Células de glioma humano de la línea 42-MG-BA son cultivadas en placa y medio MEM según un protocolo estándar. Las placas son incubadas en atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%, a  $37^\circ\text{C}$ . Tras 24 h de incubación se introduce en el cultivo celular las nanoesferas Oro-Sílice con matriz de sílice mesoporosa estructurado del Ejemplo 1 con una concentración de  $100 \mu\text{g cm}^{-3}$ . Dicho cultivo celular se trata con ultrasonidos durante 20 min para mejorar la dispersión de las nanoesferas. A continuación se expone las células a la luz de un láser pulsado (Titanio:Zafiro/Mira 900-F), emitiendo a 800 nm con pulsos de  $10^{-16}$  s. Se varia la potencia del láser entre 90 y 300 mW, utilizando un haz de 1 mm  
15 de diámetro (respectivamente, 11 y  $38 \text{ W cm}^{-2}$ ). Las placas son irradiadas longitudinalmente describiendo líneas de puntos en las que de forma creciente se varía el tiempo de exposición al haz láser. Dicho tiempo de irradiación oscila entre 0,01 y 24 min.

20 En la Figura 6c-d se muestra las imágenes obtenidas en el microscopio de contraste de fases de las células, antes y después de la exposición a la radiación infrarroja. Se aprecia una elevada destrucción fototérmica de las células con nanoesferas de Oro-sílice tras 16 min de exposición a un haz de  $38 \text{ W cm}^{-2}$ .

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# REIVINDICACIONES

1. Un material híbrido nanoestructurado **caracterizado** porque comprende al menos dos componentes:

- un núcleo metálico, que comprende nanopartículas de oro, dando lugar a un nanocluster de oro y
- una matriz que envuelve el núcleo metálico.

2. Un material híbrido nanoestructurado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende al menos dos componentes:

- un núcleo metálico, constituido por dos o más partículas coloidales de oro, dando lugar a un nanocluster de oro, y
- una matriz no estructurada y no porosa que envuelve el núcleo metálico.

3. Un material híbrido nanoestructurado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende al menos dos componentes:

- un núcleo metálico, constituido por dos o más partículas coloidales de oro, dando lugar a un nanocluster de oro, y
- una matriz no estructurada y porosa, con diámetro de poro comprendido entre 1 y 100 nm, que envuelve el núcleo metálico.

4. Un material híbrido nanoestructurado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende al menos dos componentes:

- un núcleo metálico, constituido por dos o más partículas coloidales de oro, dando lugar a un nanocluster de oro, y
- una matriz estructurada y porosa, con diámetro de poro comprendido entre 1 y 30 nm, que envuelve el núcleo metálico.

5. Un material híbrido nanoestructurado según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la matriz que envuelve el núcleo metálico es una matriz no estructurada y no porosa, y es de sílice.

6. Un material híbrido nanoestructurado según la reivindicación 1 o 3, **caracterizado** porque la matriz que envuelve el núcleo metálico es no estructurada y porosa, con diámetro de poro comprendido entre 1 y 100 nm, y es de sílice.

7. Un material híbrido nanoestructurado según la reivindicación 1 o 4, **caracterizado** porque la matriz que envuelve el núcleo metálico es estructurada y porosa, con diámetro de poro comprendido entre 1 y 30 nm, y es de un compuesto de silicio.

8. Un material material híbrido nanoestructurado según la reivindicación 1 ó 7 **caracterizado** porque está compuesto de nanopartículas que presentan una matriz silíceas con orden a larga distancia.

9. Un material material híbrido nanoestructurado según la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicha matriz silíceas está seleccionada entre una matriz con estructura tipo MCM- 41, MCM-48, MCM-50, FSM-16, HMS, KIT-1, MSU-1, MSU-2, MSU- 3, MSU-V, SBA-1, SBA-2, SBA-3, SBA-8, SBA-11, SBA-12, SBA- 14, SBA-15, SBA-16, STAC-1, M $\alpha$  y PCH.

10. Un material según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la distancia centro de poro a centro de poro en la matriz de sílice está comprendida entre 3,4 y 4,2 nm, y el espesor de la pared oscila entre 1 y 2 nm.

11. Un material según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque las nanopartículas del material híbrido presentan forma esférica, hexagonal o alargada.

12. Un material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 **caracterizado** porque las nanopartículas del material híbrido presentan un diámetro medio comprendido entre 80 y 300 nm.

13. Un material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 **caracterizado** porque las nanopartículas del material híbrido contienen preferentemente entre 2 y 20 nanopartículas de oro dentro de la matriz.

14. Un material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 **caracterizado** porque las nanopartículas de oro presentan un tamaño uniforme comprendido entre 10 y 60 nm.

## ES 2 319 056 B1

15. Un método de preparación del material híbrido definido en la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende poner en contacto una solución coloidal de oro con una solución acuosa de un compuesto inorgánico y mantener la agitación para permitir el crecimiento de la matriz inorgánica que envuelve al núcleo metálico en torno al nanocluster de oro.

16. Un método de preparación según la reivindicación 15, **caracterizado** porque comprende además lavar y secar el material híbrido obtenido a una temperatura de al menos 100°C.

17. Un método de preparación según la reivindicación 15, **caracterizado** porque dicho compuesto inorgánico es un compuesto de silicio.

18. Un método de preparación según la reivindicación 17, **caracterizado** porque dicho compuesto de silicio está seleccionado entre un alcóxido de silicio, un alquilsilano, silicato sódico y sílice coloidal.

19. Un método de preparación según la reivindicación 15, **caracterizado** porque comprende introducir un co-solvente a la solución acuosa del compuesto inorgánico con una relación co-solvente:agua en volumen comprendida entre 1:1 y 4:1.

20. Un método de preparación según la reivindicación 19, **caracterizado** porque dicho compuesto inorgánico es un compuesto de silicio.

21. Un método de preparación según la reivindicación 19, **caracterizado** porque dicho co-solvente está seleccionado entre un alcohol de cadena alifática con un número de carbonos comprendido entre 1 y 6.

22. Un método de preparación según una de las reivindicaciones 15 a 21, **caracterizado** porque comprende lavar y secar el material híbrido formado e introducir dicho material híbrido en una disolución acuosa de una fuente de fluoruro.

23. Un método de preparación del material híbrido según la reivindicación 15 o 22, **caracterizado** porque dicha solución acuosa es una solución de un compuesto de silicio, y dicho método comprende además:

- lavar y secar el material híbrido formado,
- introducir dicho material híbrido en una disolución acuosa de una fuente de fluoruro con una relación molar  $\text{SiO}_2/\text{F}$  comprendida entre 5 y 500,
- calentar el gel resultante a una temperatura entre 20 y 100°C, durante un periodo entre 1 y 180 horas, y
- lavar el sólido obtenido y secarlo a una temperatura no inferior a 100°C.

24. Un método según la reivindicación 23 **caracterizado** porque el compuesto de silicio es un alcóxido de silicio, un alquilsilano, silicato sódico o sílice coloidal.

25. El método según la reivindicación 23 **caracterizado** porque el compuesto de fluoruro es ácido fluorhídrico o una sal amónica, sódica o potásica del mismo.

26. El método según la reivindicación 23 **caracterizado** porque comprende introduce un co-solvente a la solución acuosa del compuesto de silicio en una relación co-solvente:agua en volumen comprendida entre 1:1 y 4:1.

27. El método según la reivindicación 26 **caracterizado** porque comprende dicho co-solvente es un alcohol de cadena alifática con un número de carbonos comprendido entre 1 y 6.

28. Un método según la reivindicación 15 **caracterizado** porque comprende:

- poner en contacto una solución coloidal de oro con una solución acuosa de un compuesto inorgánico,
- mantener la agitación para permitir el crecimiento de la matriz inorgánica que envuelve al núcleo metálico en torno al nanocluster de oro,
- lavar y secar el material híbrido formado,
- introducir el material híbrido en una disolución acuosa de un surfactante orgánico, con una relación molar  $\text{SiO}_2$ :surfactante comprendida entre 0,01 y 0,60, obteniendo un gel,
- calentar el gel resultante a una temperatura entre 60 y 200°C durante un periodo entre 0,1 y 180 horas, y
- lavar y secar el sólido obtenido a una temperatura de al menos 450°C, obteniéndose el material híbrido definido en la reivindicación 4.

## ES 2 319 056 B1

29. El método según la reivindicación 28, **caracterizado** porque la matriz inorgánica es de un compuesto de silicio seleccionado entre un alcóxido de silicio, un alquilsilano, silicato sódico y sílice coloidal.

5 30. El método según la reivindicación 28, **caracterizado** porque el surfactante orgánico es un compuesto catiónico, aniónico o neutro.

10 31. El método según la reivindicación 28, **caracterizado** porque la matriz inorgánica es de un compuesto de silicio, y se introduce un co-solvente a la solución acuosa del compuesto de silicio en una relación co-solvente:agua en volumen comprendida entre 1:1 y 4:1.

32. El método según la reivindicación 31 **caracterizado** porque el co-solvente es un alcohol de cadena alifática con un número de carbonos comprendido entre 1 y 6.

15 33. Uso de un material híbrido nanoestructurado que comprende al menos dos componentes:

- un núcleo metálico, que comprende partículas coloidales de oro, dando lugar a un nanocluster de oro y
- una matriz que envuelve el núcleo metálico, en una aplicación biotecnológica que comprende:

20 a. poner en contacto una o más células con nanopartículas de un material híbrido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y

25 b. exponer las células conteniendo las nanoesferas del material híbrido a una fuente de radiación electromagnética cuya longitud de onda esté comprendida en el intervalo de absorbanza plasmónica de las nanopartículas y nanoclusters de oro.

34. Uso según la reivindicación 33, **caracterizado** porque las células conteniendo las nanopartículas del material híbrido son expuestas a una radiación electromagnética cuya longitud de onda se encuentra entre 800 y 1300 nm.

30 35. Uso según la reivindicación 33 ó 34, **caracterizado** porque la radiación electromagnética es de intensidad suficiente para generar calor en las nanopartículas en cantidad efectiva para destruir o lesionar irreversiblemente las células.

35 36. Uso según una de las reivindicaciones 33 a 35, **caracterizado** porque la fuente de radiación electromagnética es un láser.

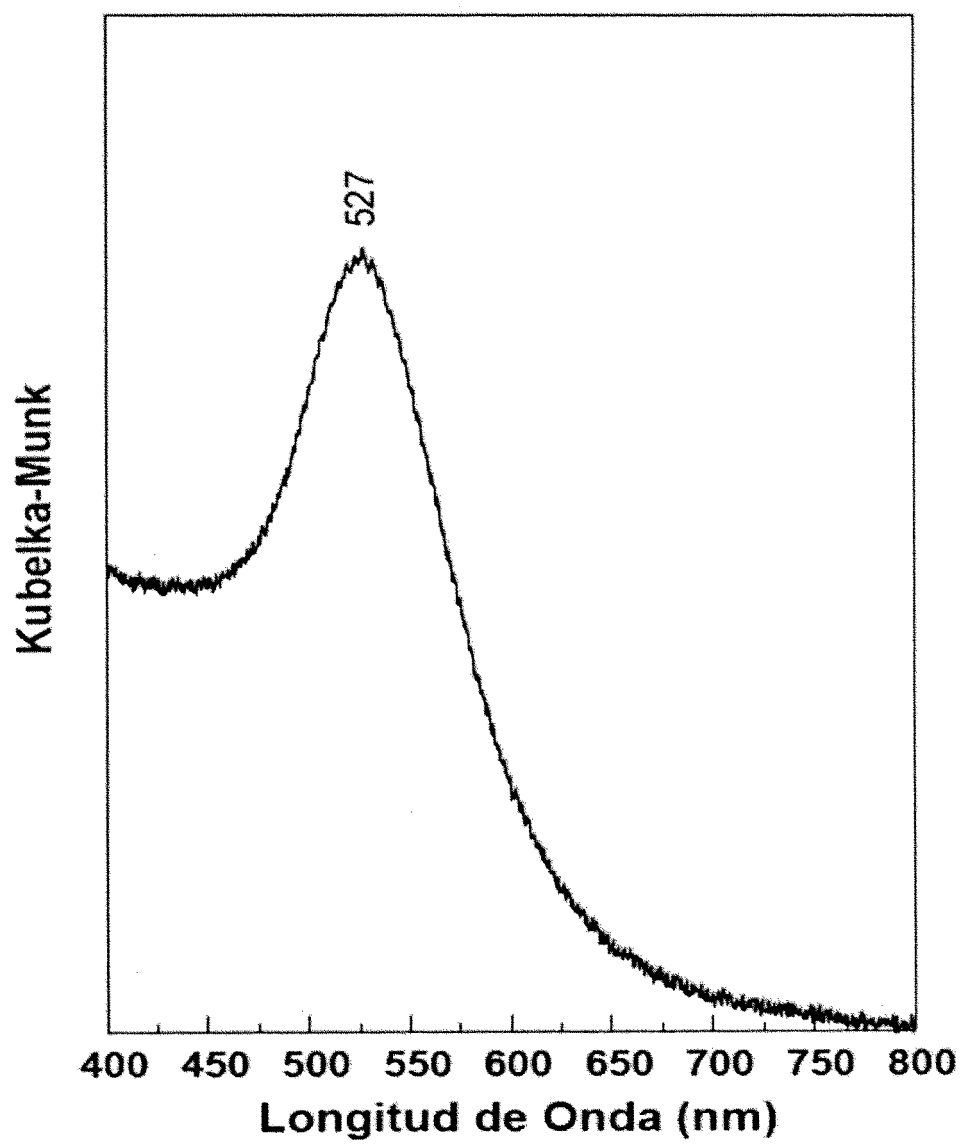


Figura 1

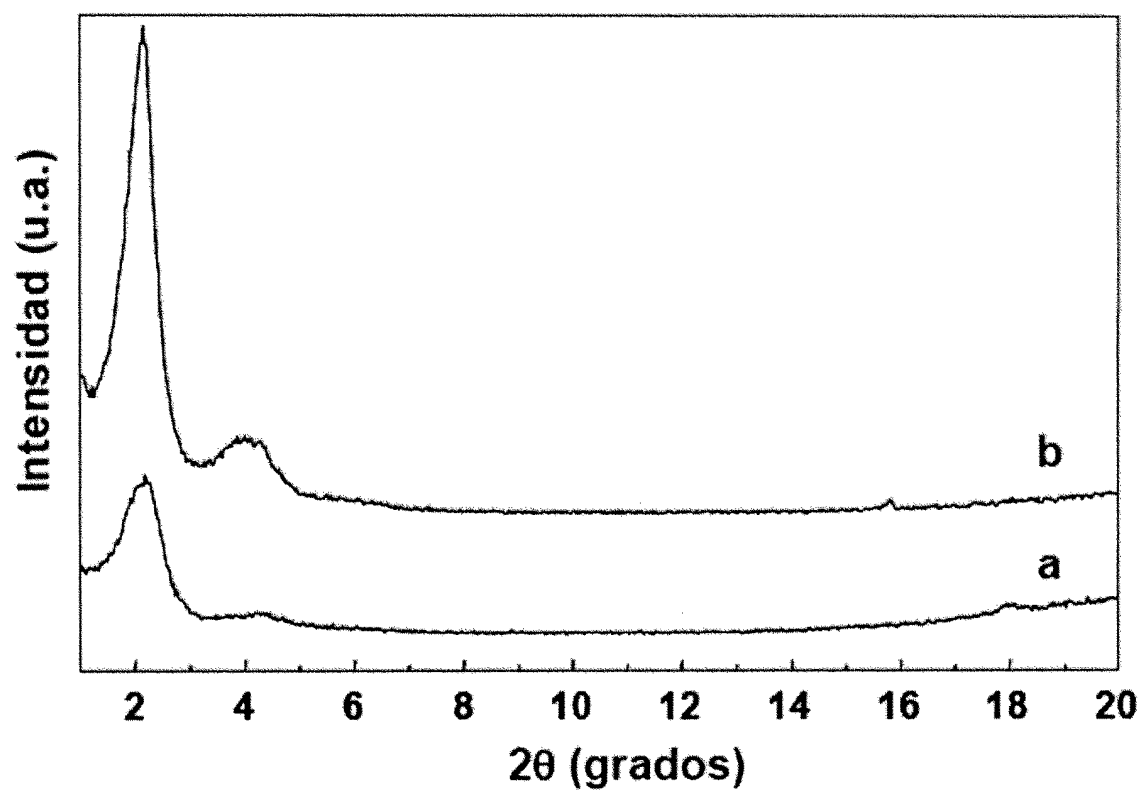


Figura 2

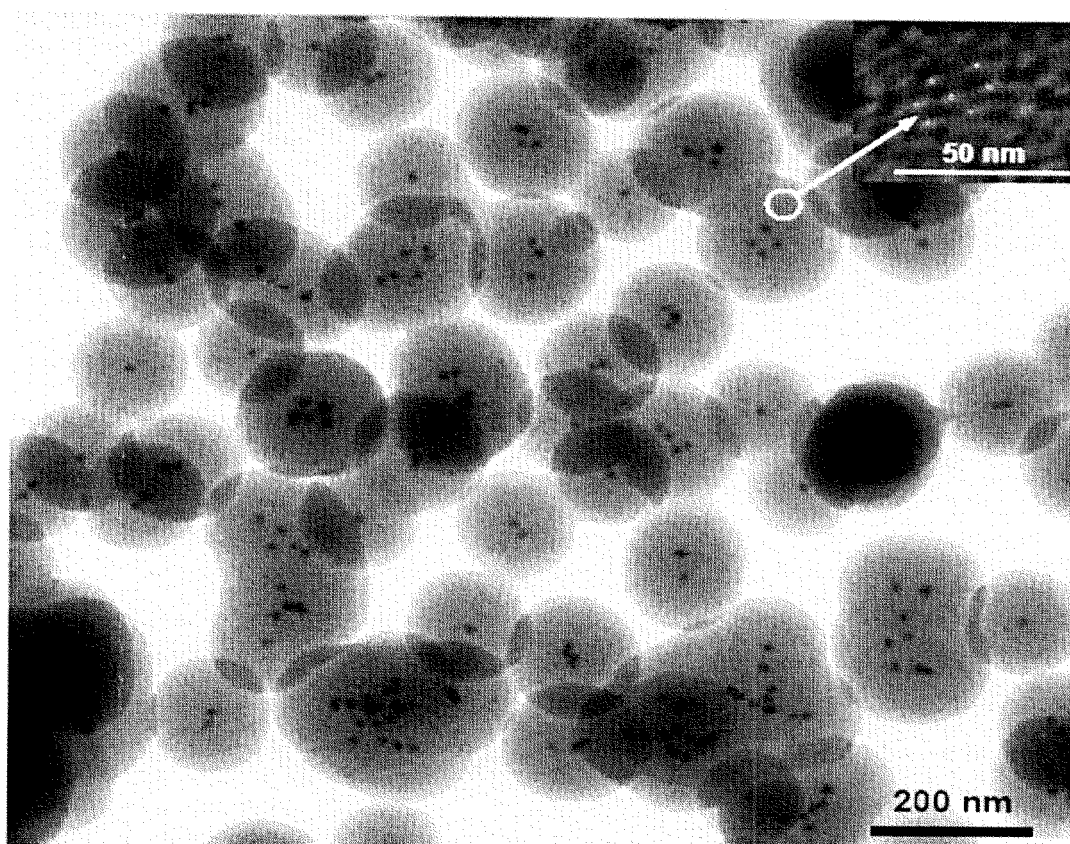


Figura 3

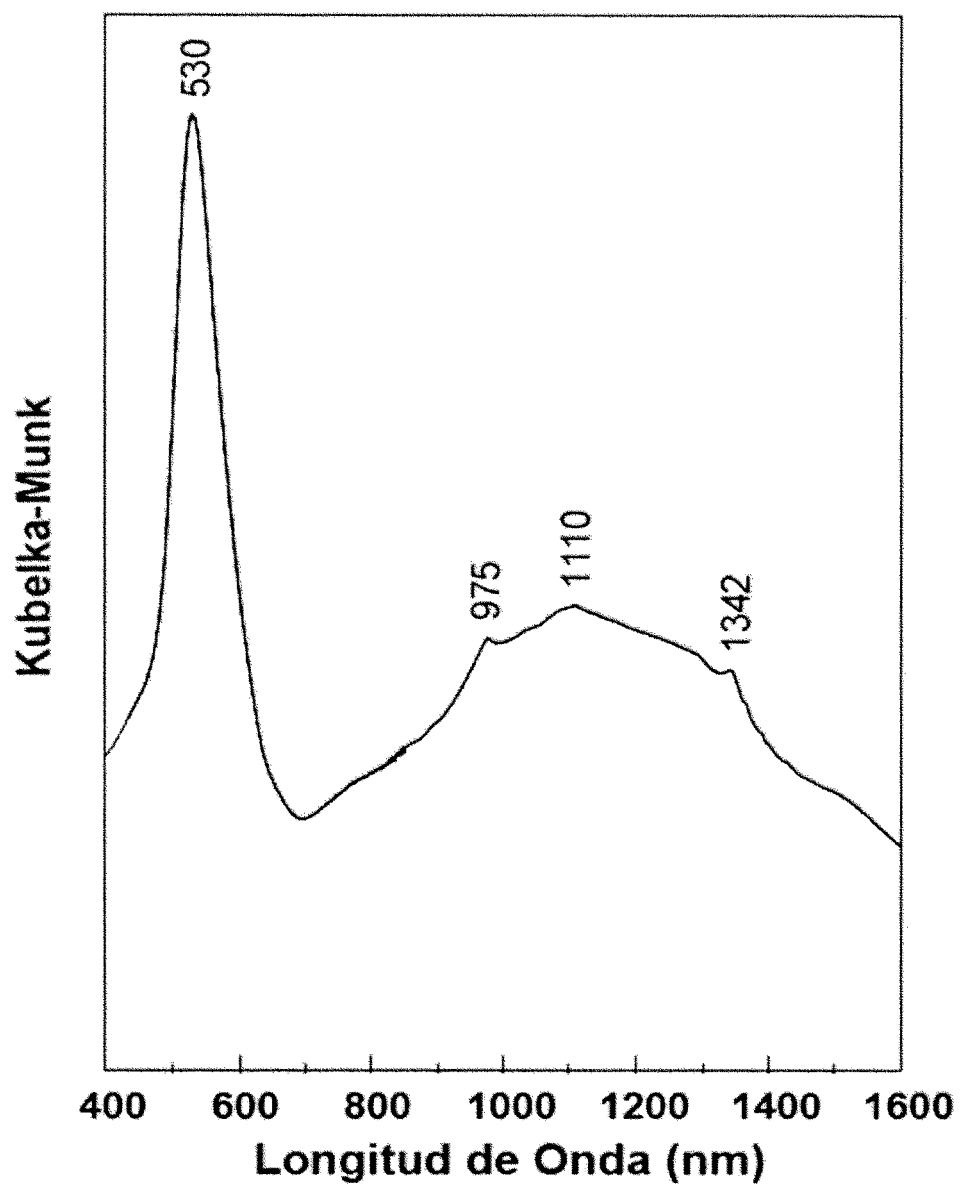


Figura 4



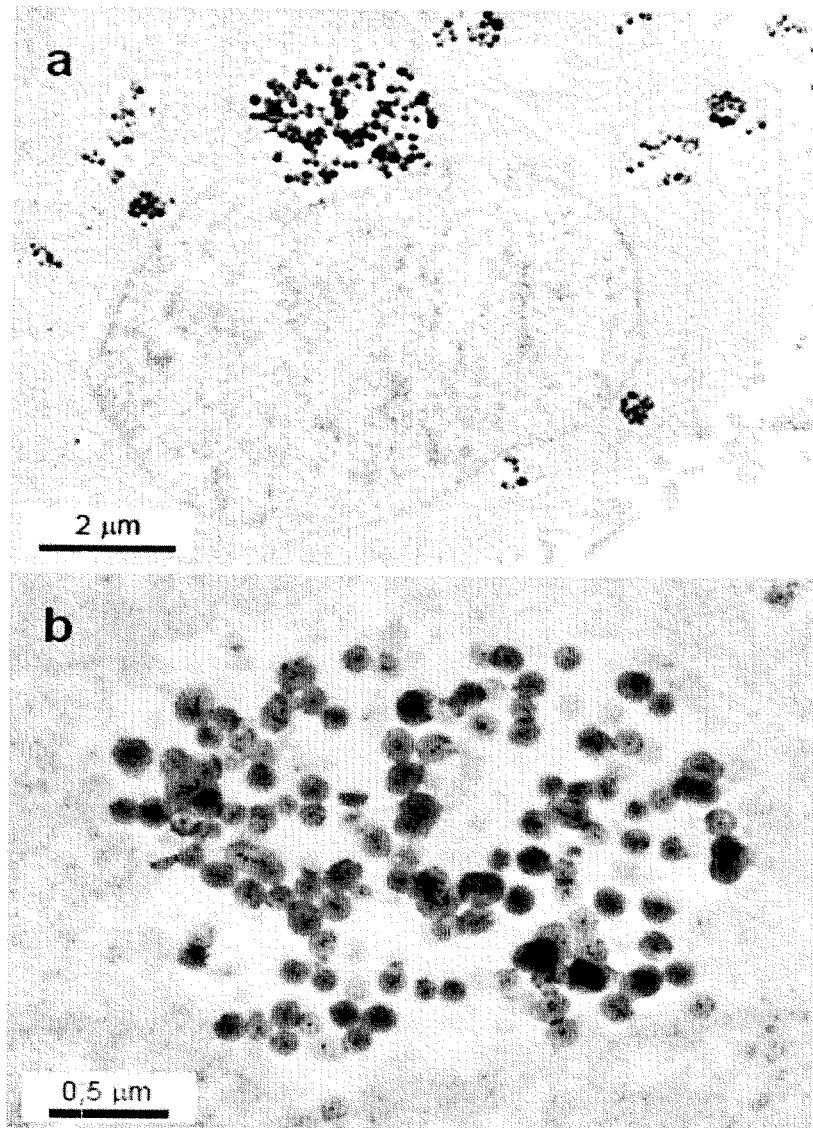


Figura 5

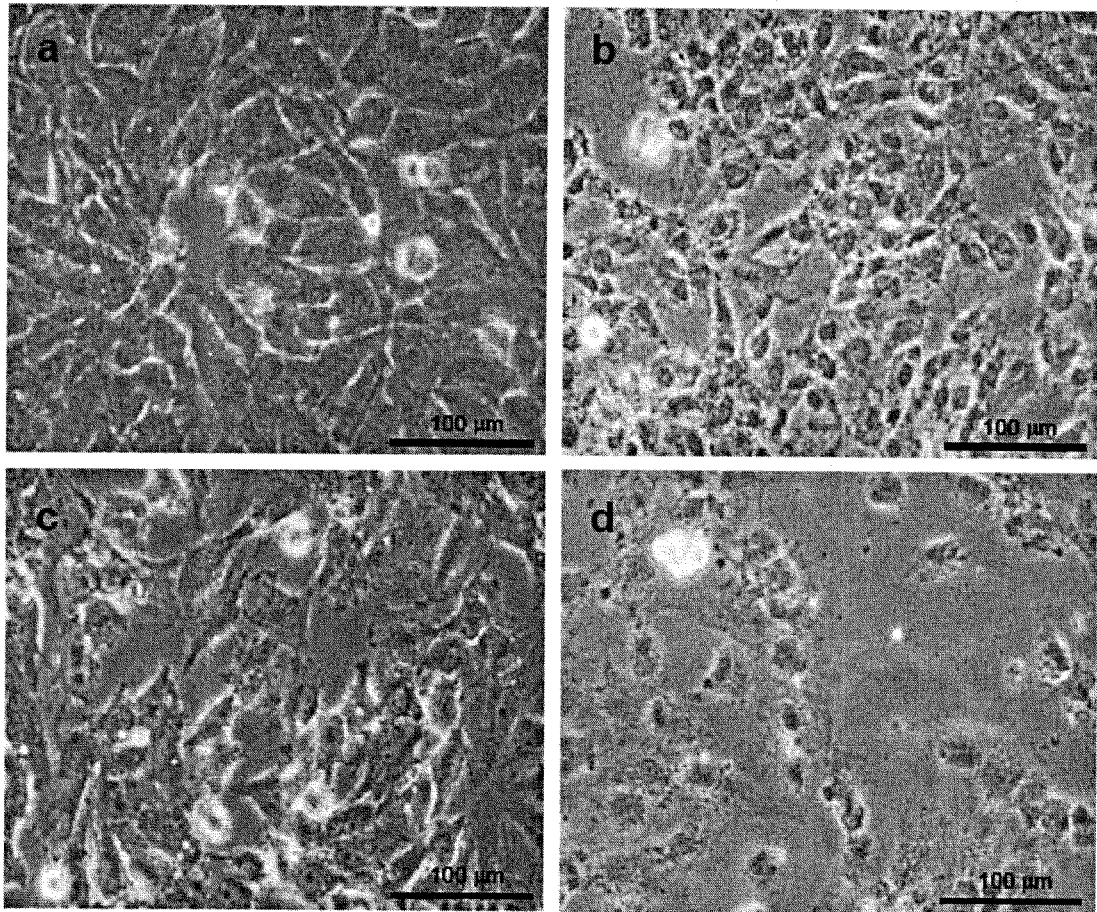


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 319 056

⑫ Nº de solicitud: 200702285

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 14.08.2007

⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BOTELLA, P. et al. "Single Gold Nanoparticles Encapsulated in Monodispersed Regular Spheres of Mesoporous Silica Produced by Pseudomorphic Transformation" Chem. Mater. 17.03.2007 Vol. 19 Páginas 1979-1983, apartados "Experimental Section", "Conclusions".	1-32
X	NOONEY, R.I. et al. "Self-Assembly of Mesoporous Nanoscale Silica/Gold Composites" Langmuir. 25.07.2003 Vol. 19 Páginas 7628-7637, apartado "Experimental Section".	1-32
X	CHEN, W. et al. "Sonochemical Processes and Formation of Gold Nanoparticles within Pores of Mesoporous Silica" Journal of Colloid and Interface Science 2001 Vol. 238, Páginas 291-295, apartado II "Materials and Methods".	1-7

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

13.04.2009

Examinador

V. Balmaseda Valencia

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 47/00** (2006.01)

**A61N 5/06** (2006.01)

**B22F 1/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61N, B22F

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.04.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-32	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-32	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Chem. Mater. Vol.19 Páginas 1979-1983	17.03.2007
D02	Langmuir Vol. 19 Páginas 7628-7637	25.07.2003
D03	Journal of Colloid and Interface Science Vol. 238, Páginas 291-295	2001

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El documento D01 se refiere a la síntesis de un material híbrido nanoestructurado que comprende un núcleo metálico, constituido por dos o más nanopartículas coloidales de oro con un tamaño comprendido entre 15nm-30nm y una matriz de sílice mesoporosa cuyo diámetro medio está comprendido 100-350 nm y su espesor de pared entre 2-4 nm. La estructura del material resultante es típica de materiales MCM-41. Se obtienen nanopartículas esféricas de oro encapsuladas en una matriz de sílice mesoporosa mediante la agitación magnética de una disolución coloidal de oro en contacto con una disolución de 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) en una mezcla etanol-agua (2.5:1v/v). A continuación, se lava, se seca y se diluye en una solución alcalina de CTAB, el gel resultante se calienta a una temperatura de 200°C durante 0.25-24 horas y tras su centrifugación se calcina a 540 °C durante 6 horas (Experimental Section). Finalmente, se destaca el uso de estos materiales nanohíbridos en aplicaciones biotecnológicas (Conclusions).

En el documento D02 se estudia el efecto de la concentración del surfactante, las condiciones solventes y la fuente de sílice en la síntesis de materiales híbridos nanoestructurados mesoporosos sílice/oro. Dicha síntesis comprende poner en contacto una solución coloidal de oro con una solución acuosa de una fuente de sílice (TEOS, TMOS, TPOS, APS y MPTS) en presencia de una co-solvente (etanol), lavar y secar el material híbrido formado, introducir un surfactante (CTAB) que posteriormente se eliminará por calcinación en aire a 540°C durante 6h (Experimental Section). De este modo se obtienen materiales híbridos nanoestructurados mesoporosos sílice/oro con un diámetro de poro comprendido entre 80-170nm, una distancia centro de poro a centro de poro en la matriz de sílice del orden 3.5nm y un espesor de pared del orden de 1.10nm. Las nanopartículas de oro en el material híbrido presentan forma esférica y un diámetro del orden de 15nm (Results and Discussion). El documento D03 describe la síntesis de sílice mesoporosa con nanopartículas de oro en su interior mediante radiación ultrasonidos. La matriz de sílice resultante presenta una superficie BET de 579m<sup>2</sup>/g y un diámetro de poro en el rango de 2-20nm (MATERIALS AND METHODS).

Así por tanto, el objeto de la invención tal y como se ha definido en las reivindicaciones 1-32 deriva directamente y sin ningún equívoco de los documentos citados. En consecuencia, se considera que dichas reivindicaciones incumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva tal y como establecen los Artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.